

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME**

Patent Number: JP63119500  
Publication date: 1988-05-24  
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03  
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD  
Requested Patent: JP63119500  
Application Number: JP19870125443 19870522  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04  
EC Classification:  
Equivalents: JP2544136B2

---

**Abstract**

---

**NEW MATERIAL:**A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation,  $[\alpha]_D^{25} = -37$  or  $-1$  deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 ( $\text{cm}^{-1}$ ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

**USE:**A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

**PREPARATION:**For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of  $\geq 15 \times 10^4$  are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

① 日本国特許庁(JP)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報(A)

昭63-119500

④ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑤ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14  
A 61 K 31/725ABL  
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 審査請求 未請求 発明の頁 5 (全13頁)

⑥ 発明の名称 硫酸化多糖体DS 4152並びにこれを含む血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑦ 特 願 昭62-125443

⑧ 出 願 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑨ 昭61(1986)5月23日 ⑩ 日本(JP) ⑪ 特願 昭61-118847

⑫ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑬ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑭ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑮ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑯ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

## 明 細 書

グラクトース誘導体)

## 1. 発明の名称

蛋白含量(%) :  $1 \pm 0.5$  (ローリー・フォ

硫酸化多糖体DS 4152 並びにこれを含む

リン法、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

(標準)

## 2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

 $(\alpha)_D^{20} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$  (0.5% 水溶液)

を有する硫酸化多糖体DS 4152。

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

1240, 840(肩), 810( $\text{cm}^{-1}$ ; KBr)22000 $\pm$ 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、ノタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.69% S 1.05~1.17%

(7) 显色反応

P 0.77~1.06%

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量(%) :  $57 \pm 3$  (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・メルガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、窒素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、50, N<sub>2</sub>

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノビリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸の存在を認める。

水の凝固点5項記載の血管新生抑制剤。

2. 炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する炭酸糖剤。

3. 発明の詳述を説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び炭酸糖剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び炭酸糖剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、ヒドロコルチカス 49, AT-25の発酵生成物中に糖基分解作用、感染防御作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4639 が存在することが知られて

2. 炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

2. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4152 を有効成分として含有する炭酸糖剤。

5. 炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6. ステロイドが糖質コルチ: iド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体D<sub>3</sub> 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をこなつた結果、D<sub>3</sub> 4639 が強い発熱性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発熱性物質を除去すべく、更に研究をこなつていたところ、D<sub>3</sub> 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのD<sub>3</sub> 4152 と名づけられた一成分は発熱性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び炭酸糖作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基くものであり、その目的は、新規な促進化多量体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、促進化多量体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、促進化多量体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、实体形成、転移の発生等に際して重要なだけでなく、関節リウマチを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態に於いてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する諸疾患、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の促進化多量体DS 4152は、アルモロパクター sp.AT-25 (工業技術院放生

物工業技術研究所には、Microsome sp. AT-25として、FERM P-5295及びArthrofactor sp. AT-25としてFERM SP-1357の符号で寄託されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭56-67301号参照)から、その中に含まれる分子量約 $1.5 \times 10^4$ 以上の親水性物質等を適当な分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈澱法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を適当なゲルろ過媒体、例えば、セファクリル(Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

(東洋ソーダ製63000 SWカラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(R面分)とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量約 $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(L面分)をそれぞれ、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillro社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリメトリック(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm<sup>2</sup>程度)し、透過液をDS 4152として採ればよい。使用液は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(3) 固形および蛋白質の含量

固含量(%) :  $8.7 \pm 3$  (フェノール-硫酸  
法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%) :  $1 \pm 0.5$  (ローリー・フォ  
リン法、牛血清アルブミン  
標準)

(4) 比旋光度

$(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$  (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯  
1240, 840 (肩), 810 ( $\mu$ -1; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(7) 構成アミノ酸およびアミノ酸

加水分解物のアミノ酸分析計による分析  
で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シ  
アノピコリン酸、グルコサミンおよびムラ  
ミン酸の存在を認める。

以上の08 4152は、後記実施例で示す如  
く、単独でも血管新生抑制作用を有するもの  
であるが、ステロイド剤と組合せることによ  
り、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、  
08 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリ  
ン等を使用することもできる。

従来、アレドニゾロン、6-メチルアレ  
ドニゾロン、デキサメタゾン等のステロイド  
ホルモンが、炎症促進、発熱、腫瘍、ハムステ

ロール(10:2~3)または水が適量である  
り、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析液を最終まで通し、ろ液  
を数倍量のエタノール中に沈降下注ぐことに  
より生成する白色沈澱を集め、90%エタノ  
ール、エタノール、アセトンの順に洗った後、  
減圧乾燥すれば、目的とする08 4152(1  
部分)と無毒性物質(2部分)が各々得られ  
る。

こうして得られる08 4152は以下に述べる  
物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそ  
のナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

$29000 \pm 3000$

(2) 元素分析値(元素分析の結果を示す)

ル、メタノール、エタノール等の有機溶媒  
には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ピ  
ュレット反応およびローリー・フォリン反応  
は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応か  
らびニヒドリン反応も陽性。カルバゾール  
反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および糖酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、3,6-Na  
およびP(糖)の含有モル比はD-グルコー  
スを10としてそれぞれ約10:61:73  
:6である。

一服量に実験的に調製された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308(1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769(1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176(1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、糖質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Oncology 10 72(1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート、フオスフェート、ブチルアセテート、ナトリウムヘキサフルオロアルミニウムアセテート等)；ナトリウムプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート等)；メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフェート、ヘキサチネート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水素が置換になった異性体(たとえば、11 $\alpha$ -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトリウム塩(グルココルチコイド活性の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

(1) プレグナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンデシレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)；ディドロゲステロンおよびその17 $\alpha$ -アセトキシ誘導体(デュファステトン)等が挙げられる。

更にまた、メタラコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストステロンおよび

特開昭63-119500(8)

その誘導体、ヒドロステロンがあげられる。

さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メチルテストロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、性腺ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体(ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等)、エストリオールおよびその誘導体(トリプロピオネート等)があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を薬学的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の増液用製剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌薬剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

#### (発明の効果)

本発明のDS 4152はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、DS 4152単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として有

用、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS 4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、肺臓内、脳内、経口、皮下、直腸内、結腸内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、雄激素コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適量

に有用なものである。

#### (実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

#### 実施例1(A)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られたDP 4639(50F)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム(セファクリルS-300; 50×80cm)にかけて同濃度にて溶出し、18mlずつ溶出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル濾過クロマトグラフィー(炭素ソーゲル 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH6.5)を行い、ポイド・ポリュームにピークを与えず、



特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DF 4639 とその N 成分と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S および P 含量 (第 1 表)

第 1 表

	1) 糖 (%)	2) S (%)	3) 蛋白 (%)	4) P (%)
DS 4152	56	11.1	1.1	0.88
DF 4639	54	10.8	1.3	0.86
N 成分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-硫酸法 (ガラクトース換算)

2) アントノビチス法 (C.A. Antopolov, *Acta Chem. Scand.* **16**, 1521 (1962)) による

3) ローリー-フォリン法 (牛血清アルブミン換算)

4) テエンらの方法 (P.S. Chen et al., *Anal. Chem.* **28**, 1756 (1956)) による。

分子量 (ゲストラン標準) が約  $2 \times 10^5$  ~  $8 \times 10^5$  の範囲に属するフラクションを調製 (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約 50 ml まで濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ沈降下層下して、生成した沈降物を調製、これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の DS 4152 の白色粉末 3.6 g を得た。

一方、上記高速ゲル透過クロマトグラフィーでポリド・ポリユームにピークを与えるフラクションを調製 (約 90 ml)、上述の DS 4152 の場合と同様に処理して、N 成分を淡黄色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、保護基および糖の組成モル比

試体を 1 規定塩酸中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、保護基および糖のモル比は、S および P の含量 (%) から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	保護基	糖
DS 4152	0.1	1.0	7.3	0.6
DF 4639	0.2	1.0	7.3	0.6
N 成分	0.2	1.0	6.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場合

合の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 組成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152 を 3 規定塩酸中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアミノピロリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸のピークを認め、

(d) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25}$  (c=0.5, 水)

第 3 表

	比旋光度
DS 4152	-37
DF 4639	-36
N 成分	-34

(e) ゲル透過層出パターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

あると推定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行った発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

D8 4152、D7 4639 およびE部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ製03000 8#カラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(K) 紫外線吸収スペクトル

2#/ml水溶液において220~340nmに極大吸収は認められない。

(L) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840(肩)および810cm<sup>-1</sup>に、酸化多糖に特徴的な吸収を示す。

D8 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムラミン酸フオスフェートを介してメチナドグリカン部の結合した高度糖化多糖体で

第4表

試 体	用量 mg/100g	体積上昇量 <sub>7</sub>					
		開始	010	015	045	+	+
D8 4152	75	020	050	015	045	+	+
D7 4639	375	020	050	020	090	+	+
E部分	15	155	125	140	420	+	+
	75	140	200	180	520	+	+
	15	190	140	220	550	+	+
	75	180	175	265	620	+	+

・+ (陽性)、- (陰性)

(I) D8 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD<sub>50</sub>が2000mg/kg以上であった。

実施例1(加)

D7 4639 (60g)を300mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、TM10膜(418cm<sup>2</sup>、アicon社製)を用いて、室温で加圧(1.5kg/cm<sup>2</sup>)下、室温で限外ろ過した。上記ろ過を逐次しながら透過液量が約34となるまで実施した。透過液の濃糖液(約50ml)に100mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500mlのエタノール中へ投下ろ下した。生成した沈殿を熱め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、5時間)してD8 4152

特開昭63-119500 (9)

0白色粉末33%を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、  
蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(4)の  
DS 4152 と同一であつた。

糖含量 58%  
S含量 1.13%  
蛋白含量 0.9%  
P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示  
す(63000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリ  
ウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実施例2

胎児大鼠鼠血管新生阻止試験(直接法)：

胎児を用い、タイラーとフォークマン

(Nature 297:307, (1982))の方法をー

部改良した以下の方法で行つた。

局(ノーリンクロス)の4~5日胎児用  
の胎鼠鼠に、生理食塩水で溶解したDS 4152  
又はヘパリンを加し、37℃で培養した。

高糖添加2日後に、胎鼠鼠血管の発達度を  
生理食塩水のみを加した対照と比較し、ブ  
ロビット法により、50%血管新生阻止量  
(ID<sub>50</sub>値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID<sub>50</sub>値  
は、160 µgであつた。これに対し、ヘパ  
リンは、100 µgでも作用を示さなかつた。

実施例3

胎児大鼠鼠血管新生阻止試験(直接法)：

実施例2と同様に、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について同

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン  
を0.5 µg/胎鼠鼠(血管新生に影響のな  
い量)用いた。また、比較として、DP 4639  
及びE成分についてもその活性を調べた。こ  
の結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID<sub>50</sub>値)

	DS 4152	DP 4639	E成分
ID <sub>50</sub> 値 (µg/胎鼠鼠)	3	30	600

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイド  
とDS 4152 の併用によるID<sub>50</sub>値の変化を調  
べた。この結果、種々のステロイドに10

µgのDS 4152 を加えれば、それぞれの胎  
鼠鼠血管新生阻止活性が16~100倍  
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID <sub>50</sub> 値(µg/embryo)	
	単独	DS 4152(増加) と併用(倍率)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
ベタメタゾン	080	005 (160)
ナトラハイドロ	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
フルオキシメステロン	124	012 (103)
5α-アンドロステロン	232	029 (8)

特開第63-119500 (10)

この結果から明らかなように、用を収容的な血管新生抑制作用が認められた。

#### 実施例6

血管新生阻止作用 (例 100 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を 5 時/4 の割合で用い、DS 4152 は 30 時/4 または 300 時/4 となるよう調整して加えた。また、比較と CDP 4639 及び E 成分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した後、尿原血管の発達度を 100% とした時の阻止率である。

#### 実施例5

血管新生阻止作用 (例 100 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR 系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6 時間後に血液を採取した。0.313% タンゲンナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に 5 日齢受胎期胚尿原に添加し、2 日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (時/4)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	E 成分
皮下	922%	833%	868%
経口	927%	868%	628%

DS 4152 および DP 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても尿原血管新生を抑制することが認められた。

#### 実施例7

血管新生阻止作用 (例 100 法) :

ICR 系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与 6 時間後に採血し、0.313% タン

ゲンナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に 5 日齢受胎期胚尿原に添加し、2 日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6 時間経過後の血液を加えた場合の尿原血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

表 10 次

物質名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	DS 4152 投与量 (mg/kg; 30)	血中新生阻止率 (%)
コナソノアセテート (p.o.)	0	0	77
		30	75.1
1		0	-2.0
チトラハイデラ (p.o.)		30	71.7
0		0	-12.3
		30	80.7
0		0	4.0
		30	8.2
エビタスチン (i.m.)	0	0	18.4
		30	22.4
100		0	24.2
		30	27.0

表 10 次

物質名	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)
MS076	0	230±0.18 (100)	0	0
	30	0.89±0.09 (37)	30	33

(a) 投与 21 日目の平均血中濃度 ± 標準偏差、(b) 平均血中濃度の割合。  
(c) (血中濃度の割合) / (投与量) × 100

期間 63-113500 (11)

# 実施例 8

## 沈着試験：

CS71L / 6 歳マウスに同系の卵巣由受水腫瘍 MS076 を  $1 \times 10^6$  個皮下接種し、5 日目より DS 4152 を 30 mg/kg 1 日 1 回 6 回皮下投与したところ、著明な沈着効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第 10 表に示すように移植 21 日目の腫瘍平均重量は対照群の 37% (63% 抑制) であり、かつメディアン生存日数が対照群より 33% 延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸}) \times \frac{1}{2}$$

# 実施例 9

## 沈着試験：

ICR 系雄マウス (5 週齢) にチルコマ 160 (8180) を  $1 \times 10^6$  個皮下接種し、3 日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を 250 mg/kg/日の割合で 3 日間、100 mg/kg/日の割合で 1 日投与した。

DS 4152 は生理食塩水に溶解し、0.6 l もしくは 0.1 mg/kg となる様 1 日 1 回皮下もしくは腹腔内に 4 日間投与した。移植 7 日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第 11 表に示す如く酢酸コナソンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに DS 4152 を投与することにより顕著な増殖阻止作用が得ら

れ、打錠時の減量量の60～125%であつた。

表11 例

処 理	減 量 量	
	平均値±標準偏差	マ/σ%
生理食塩水 (p.p.)	Q361± Q191	1000
生理食塩水 (s.s.)	Q391± Q122	1000
酢酸コチゾン	Q340± Q162	943
0.5 4152 (Q61mg/..... p.p.)	Q361± Q070	1000
0.5 4152 (Q1mg/..... p.p.)	Q261± Q077	723
0.5 4152 (Q61mg/..... p.p.) +酢酸コチゾン	Q063± Q018	173*
0.5 4152 (Q1mg/..... p.p.) +酢酸コチゾン	Q026± Q011	74*
0.5 4152 (Q61mg/..... s.s.)	Q323± Q071	824
0.5 4152 (Q1mg/..... s.s.)	Q356± Q115	908
0.5 4152 (Q61mg/..... s.s.) +酢酸コチゾン	Q063± Q036	161**
0.5 4152 (Q1mg/..... s.s.) +酢酸コチゾン	Q036± Q018	60**

\* P<0.05, \*\* P<0.01 スチューデントt-検定による

既知し注射剤とする。

実施例12

製剤：

0.5 4152 6mg、アレフェゾン20mg、乳糖50mg、トウモロコシデンプン135mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

実施例10

製剤：

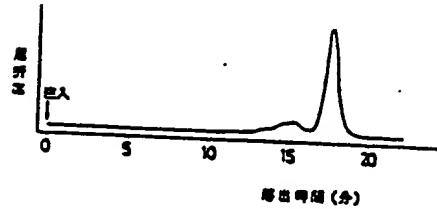
0.5 4152 6mg、乳糖300mg、トウモロコシデンプン144mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース20mgを用い、常法に従つて500mgの錠剤を調製した。この錠剤は性状にあわせて18500mg～8mgを服用する。

実施例11

注射剤：

0.5 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をメンブランフィルターでろ過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

第1図



第2図

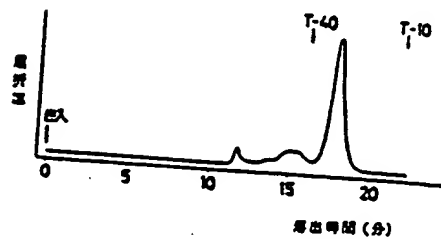


図 3 図

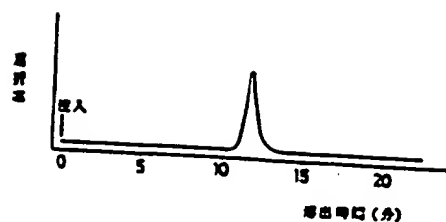
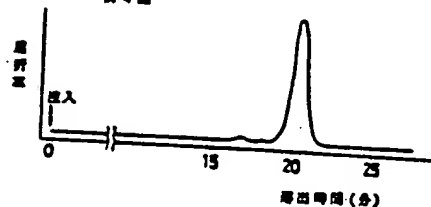


図 4 図



第 1 頁の続き

④ Int. Cl. 4

A 61 K 31/723  
37/02  
C 08 B 37/00  
C 12 P 19/04  
// (A 61 K 31/723  
31:58)

識別記号

ADU  
ABE

庁内整理番号

8615-4C  
6779-4C  
C-8515-4B  
7252-4C

⑤発明者 小河 秀正

東京都江戸川区北葛西 1 丁目 16 番 13 号 第一製薬中央研究  
所内